

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2005 THE THOMSON CORP on STN
AB DE 10056025 A UPAB: 20020424

NOVELTY - Preparation of (R)- or (S)-8-chloro-6-hydroxyoctanoic acid esters (I) involves biocatalytic reduction of the corresponding 8-chloro-6-oxo-octanoic acid esters (II).

DETAILED DESCRIPTION - Preparation of (R)- or (S)-8-chloro-6-hydroxyoctanoic acid esters (I), of formula (R)-(I) or (S)-(I) respectively, involves reduction of the corresponding 8-chloro-6-oxo-octanoic acid esters of formula (II) using a bio-catalyst.
R = 1-4C alkyl.

USE - (I) are intermediates for alpha -lipoic acid, which is useful in the treatment of diabetic polyneuropathy or acute or chronic liver diseases. In particular (R)- or (S)-(I) is useful as a chiral intermediate in the asymmetric synthesis of the natural (R)-(+)-enantiomer of alpha -lipoic acid, in which all of the biological activity is found.

ADVANTAGE - The (R)- or (S)-enantiomer of (I) can be prepared with high enantio-selectivity, despite the absence of sterically or electronically very different groups on both sides in the alpha - or beta -positions to the oxo group of (II) (usually necessary for a high level of asymmetric induction). Either enantiomer can be prepared in high yield and enantio-selectivity by choice of the biocatalyst, i.e. by using *Geotrichum candidum* to give (R)-(I) or *Mucor racemosus* to give (S)-(I). Typically (R)- or (S)-(I) can be prepared in an optical yield of 70-95%.
Dwg.0/0

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 56 025 A 1

61 Int. Cl. 7:
C 12 P 7/62
C 07 C 59/115
C 07 B 53/00

21 Aktenzeichen: 100 56 025.3
22 Anmeldetag: 11. 11. 2000
43 Offenlegungstag: 7. 2. 2002

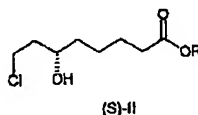
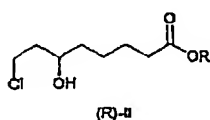
DE 100 56 025 A 1

66 Innere Priorität:
100 36 515. 9 27. 07. 2000
71 Anmelder:
ASTA MEDICA AG, 01277 Dresden, DE
74 Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München

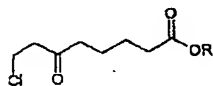
72 Erfinder:
Olbrich, Matthias, Dr., 01468 Reichenberg, DE;
Gewald, Rainer, Dr., 01217 Dresden, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern
57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von
(R)- bzw. (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der
allgemeinen Formel (R)-II oder (S)-II,



worin R die Bedeutung C₁₋₄-Alkyl hat, aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der allgemeinen Formel I,



worin R die obige Bedeutung hat.
Die Herstellung der gewünschten Enantiomeren erfolgt biokatalytisch in einer enantioselektiven Reduktion, wobei wahlweise die Stämme *Mucor racemosus* für (S)-II-Verbindungen und *Geotrichum candidum* für (R)-II-Verbindungen eingesetzt werden.
Die erhaltenen Ester können in bekannter Weise stereospezifisch zu (R)- α -Liponsäure umgesetzt werden.

DE 100 56 025 A 1

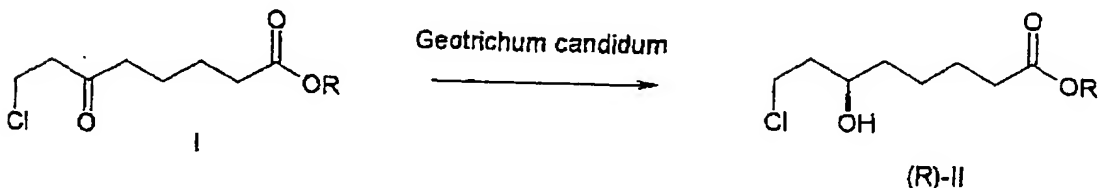
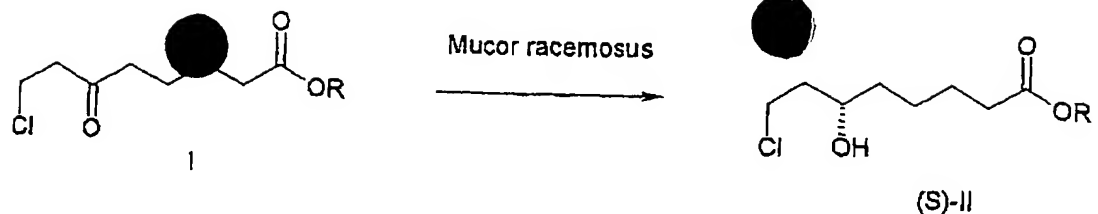
- 5 [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues biokatalytisches Verfahren zur enantioselektiven Reduktion von prochiralen 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I wahlweise mit Hilfe der Stämme *Mucor racemosus* bzw. *Geotrichum candidum* zum entsprechenden (S)- bzw. (R)-Enantiomer der Reaktionsprodukte. Nach Bildung des Chiralitätszentrums kann in bekannter Weise die weitere stereospezifische Umsetzung zu (R)- α -Liponsäure erfolgen (DE 195 33 881). Als Racemat wird α -Liponsäure vor allem zur Behandlung der diabetischen Neuropathie sowie akuter und chronischer Lebererkrankungen eingesetzt. Da ausschließlich das natürliche (R)-(+)-Enantiomer die biologische Aktivität aufweist, ist die asymmetrische Synthese dieses reinen Naturstoffes von großer Wichtigkeit.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

- 15 [0002] Die Verbindungen I sind bekannt und dienen als Zwischenprodukte der großtechnischen Herstellung von racemischer Thioctsäure (M. W. Bullock et al., J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1828).
 [0003] Für die Herstellung der enantiomerenreinen (R)- α -Liponsäure werden sowohl chemische Syntheseverfahren, aber auch Verfahren mit biokatalytischen Teilstufen in der Literatur beschrieben (Übersichtsartikel: J. S. Yadav et al., J. Sci. Ind. Res. 1990, 49, 400). Chemische asymmetrische Syntheseverfahren benötigen in der Regel kostenintensive und komplizierte Ausgangsverbindungen, da z. B. die Möglichkeiten des Einsatzes der enantioselektiven Chemokatalyse an bestimmte elektronische und sterische Strukturmerkmale gebunden sind.
- 20 [0004] Bei den Herstellungsverfahren mit biokatalytischen Teilstufen werden zum einen Enzympräparationen von Lipasen und Oxydoreductasen und zum anderen Hefe eingesetzt.
 [0005] Die bekannten lipasekatalysierten Verfahrensstufen (Y. R. Santosh Laxmi und D. S. Iyengar, Synthesis, 1996, 594; N. W. Fadnavis und K. Koteswar, Tetrahedron: Asymmetry 1997, 8, 337; N. W. Fadnavis et al., Tetrahedron: Asymmetry 1998, 9, 4109; S. Lee und Y. Ahn, J. Korean Chem. Sc. 1999, 43, 128) beruhen auf der Enantioselektivität der Esterspaltung zur Erzielung einer hohen Enantiomerenreinheit. Dabei werden racemische Gemische vorgelegt. Die biokatalytische Reaktion kann nur max. 50% des racemischen Gemisches zur Gewinnung der enantiomerenreinen Verbindung nutzen. Das verbleibende unerwünschte Enantiomer muß entweder verworfen werden oder über aufwendige Reaktionsstufen zu einem racemischen Gemisch zurückverwandelt werden.
- 30 [0006] Verfahren mit Monooxygenasen (B. Adger et al., Bioorg. Biomed. Chem. 1997, 5, 253) benötigen kostenintensive Cofaktoren, wie NADH oder NADPH oder kostenintensive Cofactorrecyclingsysteme.
 [0007] Für Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie Pilze der Gattungen *Mucor* und *Geotrichum* ist bekannt, daß sie zur biokatalytischen Umsetzung von Intermediaten fähig sind.
- 35 [0008] Hefe wird bereits seit langer Zeit in Reduktionsreaktionen von β -Ketoestern, der Esterspaltung und anderen Synthesen als Biokatalysator eingesetzt (Übersichtsartikel: S. Servi, Synthesis 1990, 93,1).
 [0009] Für *Mucor*-Arten (z. B. *Mucor miehei* und *Mucor javanicus*) sind insbesondere Reaktionen zur enantioselektiven Esterspaltung beschrieben. Während *Mucor racemosus* nur in Bezug auf die Reduktion von Tetramethylcyclohexandion (J. d'Angelo et al., J. Org. Chem. 1986, 51, 40) erwähnt wird, ist für *Geotrichum candidum* die biokatalytische Reduktion von β -Keto-Estern beschrieben (B. Wipf et al. Helv., Chim. Acta 1983, 66, 485).
- 40 [0010] Alle bisher bekannten Verfahren mit Hefe (A. S. Gopalan and H. K. Hollie, Tetrahedron Lett. 1989, 30, 5705; L. Dasaradhi et al., J. Chem. Soc., 1990, 729; M. Bezbarua et al., Synthesis, 1996, 1289; DB 40 37 440) bzw. *Geotrichum candidum* (B. Wipf et al., Helv. Chim. Acta 1983, 66, 485) vermögen nicht, Zwischenprodukte mit sauerstofffreien, kleinen Liganden in β -Position zum Reaktionszentrum enantioselektiv zu den entsprechenden S- bzw. R-Enantiomeren umzusetzen. Statt dessen werden über aufwendige Zwischenstufen große, sauerstoffhaltige Liganden in β -Position zur Keto-Gruppe eingeführt, die dann eine enantioselektive Umsetzung möglich machen.
- 45 [0011] In der hier beschriebenen Lösung wird gegenüber den bekannten Synthesen mit Ausgangsverbindungen gearbeitet, die nur sehr kleine Liganden in α - oder β -Stellung zur Ketogruppe tragen und trotzdem mit hoher Enantioselektivität umgesetzt werden.
- 50 [0012] Die hier dargestellte Lösung war gegenüber dem bekannten Stand der Technik besonders überraschend, da K. Nakamura et al., Tetrahedron Letters 29, 2453-4, 1988 beschreiben, dass nur Esterfunktionen und nicht Chloratome in Nachbarstellung zum Reaktionszentrum von Dehydrogenasen erkannt werden und zu enantioselektiven Umsetzungen führen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

- 55 [0013] Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, unter Ausnutzung von bekannten Synthesebausteinen ein einfacheres und wirtschaftlicheres Verfahren für die asymmetrische Induktion innerhalb der (R)- α -Liponsäure-Synthesesequenz auf biokatalytischer Grundlage zu finden.



[0014] Erfindungsgemäß wurde die Aufgabe dadurch gelöst, dass neue Verfahren mit Mikroorganismen gefunden wurden, die eine enantioselektive Reduktion der prochiralen 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylester der Formel I, worin R für C₁₋₄-Alkyl steht, wahlweise mit Hilfe der Stämme *Mucor racemosus* bzw. *Geotrichum candidum* zum entsprechenden (S)- bzw. (R)-Enantiomer erlauben.

[0015] Als besonders geeignet hat sich 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester erwiesen.

[0016] Die enantioselektive Reduktion prochiraler Verbindungen zum (R)-Enantiomer der Formel (R)-II erfolgt mit Hilfe von *Geotrichum candidum*. Eine Umsetzung der prochiralen Vorstufen zum (S)-Enantiomer der Formel (S)-II kann mittels *Mucor racemosus* erreicht werden.

[0017] Die hohe Enantioselektivität der Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I war insofern nicht zu erwarten, da eine hohe asymmetrische Induktion in der Literatur nur für Verbindungen beschrieben wird, bei denen sterisch oder elektronisch stark unterschiedliche Gruppen auf beiden Seiten in α - oder β -Position zur Keto-Gruppe die Selektivität begünstigen. Desweiteren war überraschend, dass darüber hinaus zwei Stämme zu finden sind, die mit hoher Ausbeute und Enantioselektivität die Umsetzung zu entgegengesetzten Enantiomeren katalysieren.

[0018] Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich gegenüber dem Stand der Technik dadurch aus, daß zur Gewinnung der 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der Formel (R)-II *Geotrichum candidum* (DSM 13776) auf einem herkömmlichen Pilznähragar, vorzugsweise Sabouraud-Glukose-Agar, angezogen wird. Für die Vorkultur des Stammes wird ein komplexes Medium, vorzugsweise mit 1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 2% Glukose, verwendet. Eine weitere Vermehrung der Biomasse wird in einem vollsynthetischen Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle, Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle sowie weiteren Nährsalzen erreicht, vorzugsweise in der Zusammensetzung 20 g/l Glukose, 3 g/l (NH₄)₂SO₄, 4 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄, 0,2 g/l NaCl, 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l FeCl₃ × 6 H₂O, 3 mg/l CaCl₂ × 2 H₂O, 0,4 mg/l MnSO₄ × H₂O, 0,5 mg/l ZnSO₄ × 7 H₂O und 0,05 mg CuSO₄ × 5 H₂O. Die Kultivierung der Vorkultur als auch der Hauptkultur wird bei 19 bis 28°C, vorzugsweise 24°C, und über 1 bis 5 Tage, vorzugsweise 3 Tage, geschüttelt auf einem Rundschüttler bei 100 bis 300 rpm, vorzugsweise 190 rpm durchgeführt.

[0019] Die eigentliche biokatalytische Umsetzung wird in einer gepufferten wässrigen Lösung unter Zusatz von Glukose als Energiequelle durchgeführt. Die Konzentration des Biokatalysators beträgt 0,1 bis 100 g Biotrockenmasse pro Liter, vorzugsweise 5 g Biotrockenmasse pro Liter. Das Substrat wird in einer Konzentration von 5 g/l dem Biotransformationsansatz zugegeben. Die Biotransformation wird unter Schütteln bei 24°C über 1 bis 3 Tage durchgeführt.

[0020] Nach Abschluß der Biotransformation wird die Biomasse abzentrifugiert und der Überstand mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Ethylacetat, zweimal extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt enthält Anteile von (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (R)-II (R = H), die auf bekannte Weise durch anschließende Veresterung mit in den jeweiligen Alkylester überführt werden (DE 195 33 881).

[0021] Die Kultivierung von *Mucor racemosus* (DSM 13775) sowie die Umsetzungen damit erfolgen analog wie für *Geotrichum candidum* beschrieben.

[0022] Das Rohprodukt enthält Anteile von (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (S)-II (R = H), die auf bekannte Weise durch anschließende Veresterung in den jeweiligen Alkylester überführt werden (DE 195 33 881).

[0023] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen (R)-II und (S)-II weisen in der Regel einen hohen Enantiomerenüberschuss auf, entsprechend einer optischen Ausbeute von 70–95%. Die Enantiomerenverhältnisse werden direkt durch chirale Gaschromatographie an optisch aktiven Säulen gemessen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

[0024] Der Stamm *Mucor racemosus* (DSM 13775) wird auf einem Sabouraud-Agar bei 24°C angezogen. 100 ml YPD-Nährlösung (1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 2% Glukose) wird mit einer Impföse beimpft und für 3 Tage bei 24°C auf einem Rundschüttler (190 rpm) inkubiert. 10% dieser Vorkultur werden in 100 ml SMG-Medium (20 g/l Glukose,

3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l MgSO_4 , 0,2 g/l NaCl , 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,4 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,05 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ überführt und weitere 3 Tage bei 24°C kultiviert.

[0025] Die erhaltene Biomasse wird abzentrifugiert und in 100 ml gepufferte wäßrige Lösung (50 mmol Na-Phosphatpuffer, pH 6,5) mit 5 g/l Glukose überführt. 0,5 g 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester werden in 2 ml Ethanol gelöst und dem Biotransformationsansatz zugesetzt. Nach 24 h wird die Biomasse abgetrennt und das Medium zweimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit 10 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 0,04 ml konz. HCl 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Ethylacetat/Hexan = 3 : 1) des Rückstandes erhält man 0,33 g (66%) (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 92% (chirale GC).

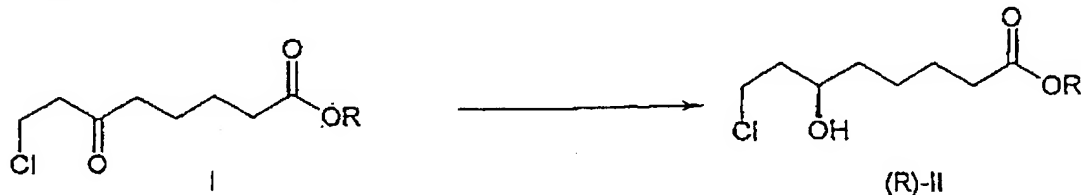
Beispiel 2

[0026] Der Stamm *Geotrichum candidum* (DSM 13776) wird auf einem Sabouraud-Agar bei 24°C angezogen. 100 ml YPD-Nährlösung (1% Hefeextrakt, 2% Pepton und 2% Glukose) wird mit einer Impföse beimpft und für 3 Tage bei 24°C auf einem Rundschtüttler (190 rpm) inkubiert. 10% dieser Vorkultur werden in 100 ml SMG-Medium (20 g/l Glukose, 3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l MgSO_4 , 0,2 g/l NaCl , 0,2 g/l Hefeextrakt, 3 mg/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,4 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,5 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,05 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) überführt und weitere 3 Tage bei 24°C kultiviert.

[0027] Die erhaltene Biomasse wird abzentrifugiert und in 100 ml gepufferte wässrige Lösung (50 mmol Na-Phosphatpuffer, pH 6,5) mit 5 g/l Glukose überführt. 0,5 g 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester werden in 2 ml Ethanol gelöst und dem Biotransformationsansatz zugesetzt. Nach 24 h wird die Biomasse abgetrennt und das Medium zweimal mit je 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit 10 ml Methanol aufgenommen und nach Zusatz von 0,04 ml konz. HCl 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel abdestilliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Ethylacetat/Hexan = 3 : 1) des Rückstandes erhält man 0,31 g (62%) (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylester mit einem Enantiomerenüberschuß von 88% (chirale GC).

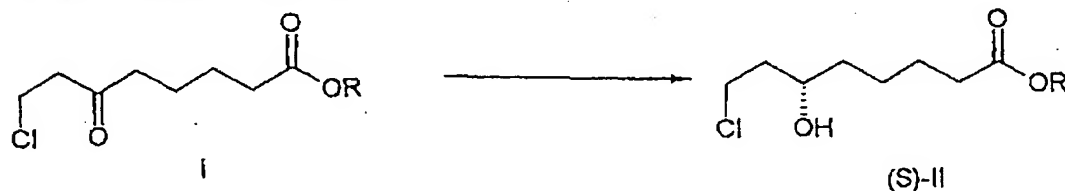
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel (R)-II aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I,



worin R jeweils die Bedeutung C_{1-4} -Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mittels eines Biokatalysators durchführt.

2. Verfahren zur Herstellung von (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel (S)-II aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der Formel I,



worin R jeweils die Bedeutung C_{1-4} -Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion mittels eines Biokatalysators durchführt.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als prochirale Ausgangsverbindung 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester einsetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Biokatalysator einen Stamm der Spezies *Geotrichum candidum* einsetzt.

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass man *Geotrichum candidum* mit dem speziellen Stamm (DSM 13776) einsetzt.

6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Biokatalysator einen Stamm der Spezies *Mucor racemosus* einsetzt.

7. Verfahren nach Ansprüchen 2 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass man *Mucor racemosus* mit dem speziellen Stamm (DSM 13775) einsetzt.

8. Verfahren nach Ansprüchen 1, 2, 4-7, dadurch gekennzeichnet, dass man für die biotechnologische Produktion

ein vollsynthetisches Medium benutzt, das eine Kohlenstoffquelle, eine anorganische Stickstoffquelle sowie weitere Nährsalze enthält.

9. Verfahren nach Ansprüchen 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahren anfallende (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (R)-II oder (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure der Formel (S)-II, worin R jeweils die Bedeutung Wasserstoff hat, durch Veresterung in bekannter Weise zu dem Alkylester der Formel (R)-II oder (S)-II, worin R jeweils C₁₋₄-Alkyl bedeutet, umgesetzt wird.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65